

VU Research Portal

Wat een tering secreteet

Bitter, Wilbert

2011

document version

Peer reviewed version

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bitter, W. (2011). *Wat een tering secreteet*.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Oratie uitgesproken door:

Prof. Dr. Wilbert Bitter

bij de aanvaarding van het ambt van
hoogleraar in de Moleculaire en Medische Microbiologie

3 maart 2011



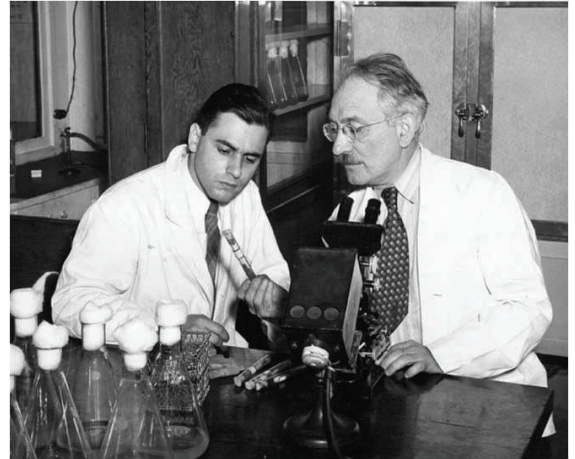
VU
1555
UNIVERSITY
AMSTERDAM

VU university medical center

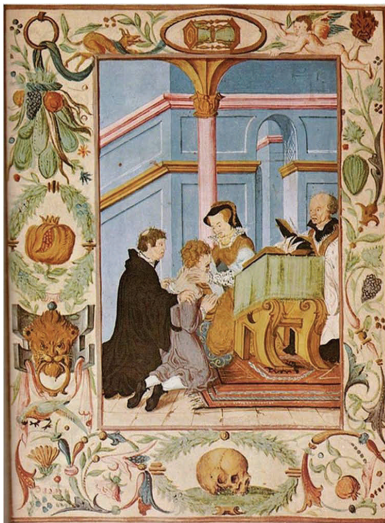


Mijnheer de rector, dames en heren,

Kort na de tweede wereldoorlog maakte Selman Waksman een reis langs verschillende Europese ziekenhuizen en instituten. Een paar jaar eerder werd in zijn laboratorium Streptomycine ontdekt, het eerste middel dat werkte tegen de gevreesde tuberculosebacterie. In eerste instantie was het lastig om artsen ervan te overtuigen dat er een middel bestond dat tuberculose zou kunnen genezen. Tuberculose bestond namelijk al sinds menscheugenis, en al net zo lang heeft men gezocht naar een middel voor genezing. De Romeinen adviseerden een bad in menselijke urine, liefst van mensen die kool gegeten hadden, terwijl in de middeleeuwen de aanraking door een koning voldoende zou zijn om scrofula, tuberculose van de lymfklieren, te genezen. Op speciale dagen stonden mensen in lange rijen om de koning te mogen zien.



Koning Charles II zou op deze manier meer dan 90.000 mensen hebben “genezen”. Zoals u zich kunt voorstellen was niet elke monarch even gelukkig met deze helende gave. In de 19^e eeuw was er de opkomst van de sanatoria waarbij goed eten, veel bedrust en



vooral de gezonde berglucht voor genezing zouden zorgen. De Zwitserse plaats Davos heeft er zijn bekendheid aan te danken en het sanatoriumleven daar is vereeuwigd in het boek ‘der Zauberberg’ van Thomas Mann.

Maar ook in mijn geboortedorp, Laren in het Gooi, waren verschillende sanatoria. Of de patiënten baat hadden bij deze behandeling is nooit helemaal duidelijk geworden, maar het voordeel was wel dat besmettelijke patiënten de ziekte niet meer konden verspreiden. Voor de minder bedeelden verkocht de Oostenrijkse firma Göbel flessen met berglucht die je een half uur voor het slapen gaan moest openen.

Zelfs Robert Koch, de ontdekker van de tuberculosebacterie, probeerde een geneesmiddel voor tuberculose te vinden. In 1890 werd zijn geneesmiddel, tuberculine, groots aangekondigd. Het werd echter de grootste

teleurstelling en vernedering in zijn imposante carrière. Zijn geneesmiddel bleek later wel gebruikt te kunnen worden om, door de zogenaamde Mantoux test, besmetting met de tuberculosebacterie aan te tonen. Ook de eerste antibiotica, Prontosil en Penicilline, die als tovermiddel mensen uit een zekere dood konden terughalen, hadden geen effect op deze ‘koning van de infectieziekten’. Als je eigen immuunsysteem niet in staat was de tuberculosebacterie in bedwang te houden was je ten dode opgeschreven.



Het is dus niet verwonderlijk dat de claim van Selman Waksman, een microbioloog die zich voornamelijk bezig hield met grondbacteriën, in eerste instantie met enige argwaan bekeken werd. Echter, al snel bleek dat Streptomycine anders was. Eerst werden cavia's succesvol behandeld en daarna dodelijk zieke patiënten met verschillende vormen van tuberculose. De toestand van de patiënten ging met sprongen vooruit, de koorts verdween snel en ook de eetlust kwam direct terug. Wat wel opviel was dat, in vergelijking met andere infectieziekten, er een veel langere behandeltijd nodig was, van wel enige maanden. Binnen een paar jaar werd streptomycine wereldwijd verkocht en gebruikt.

Tijdens zijn reis door Europa bezocht Selman Waksman ook het Salpêtrière ziekenhuis in Parijs waar 2 kleine kinderen, die genezen waren van tuberculose met behulp van streptomycine, hem bloemen aanboden. Selman was ontroerd en dankbaar dat hij hier aan bij had gedragen. Een jaar later echter kreeg Waksman een brief uit Parijs dat een van de patientjes opnieuw tuberculose had gekregen en dit keer in een vorm die resistent was tegen streptomycine.

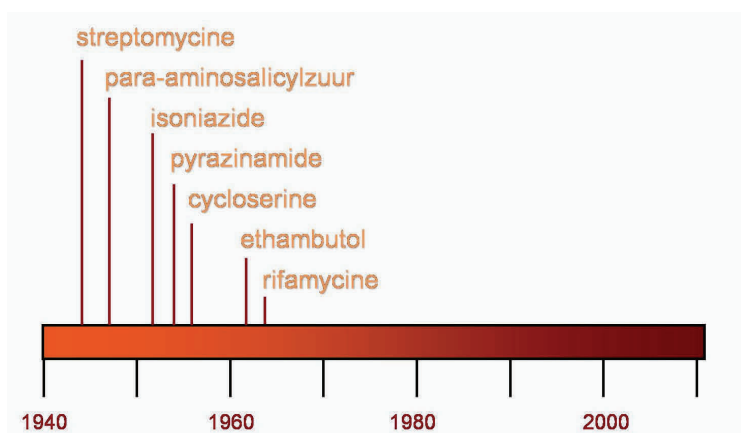
Het jongetje stierf enige tijd later. Een grote studie in 1948 liet eenzelfde beeld zien, bijna alle patiënten met longtuberculose die met streptomycine behandeld waren, vertoonden in eerste instantie een opmerkelijke verbetering, maar deze verbetering was tijdelijk en het sterftepercentage in de met streptomycine behandelde groep was even hoog als in de controle groep. Deze geschiedenis leert ons twee belangrijke feiten. Ten eerste dat de tuberculosebacterie wel degelijk bestreden kan worden, en ten tweede dat de tuberculosebacterie een echt secreet is dat nooit en te nimmer onderschat mag worden.

Dat tuberculose behandeld kan worden werd al snel bevestigd, want, hoewel streptomycine op zichzelf niet afdoende is, werden er meer antibiotica ontdekt die werkzaam waren. De doorbraak was de behandeling met een combinatie van 3 verschillende antibiotica, deze zorgde wel voor volledige genezing. De tuberculose leek overwonnen. Het 2^e punt is kennelijk moeilijker te begrijpen en is helaas opnieuw actueel. In de jaren zestig en zeventig is de aandacht voor tuberculose namelijk erg afgenomen en werd er weinig onderzoek meer naar gedaan.

Zo is er sinds 1963 geen antibioticum op de markt gekomen met een nieuw werkingsmechanisme gericht tegen tuberculose. Tuberculose was en is echter niet definitief overwonnen en heeft in de jaren tachtig een nieuwe bondgenoot gevonden in het HIV virus. Dit virus, dat zich razendsnel verspreidde over de wereld, tast met name CD4 T cellen aan. Juist deze T cellen zijn belangrijk om een infectie met de tuberculosebacterie onder controle te houden. Het gevolg is dan ook dat latente tuberculose snel gereactiveerd wordt in AIDS patiënten.

Daarnaast zijn er steeds resistentere vormen van de tuberculosebacterie verschenen, eerst verscheen de multiresistente tuberculose, MDR-TB, die veel moeilijker te behandelen was. Enige jaren geleden kwam daar de nog resistentere XDR-TB bij, die nagenoeg onbehandelbaar is. Tenslotte is onlangs in twee landen een "totaal resistente" TDR-TB gevonden.

Hoewel de situatie in Nederland nog goed onder controle is, sterven er jaarlijks wereldwijd meer dan 1,5

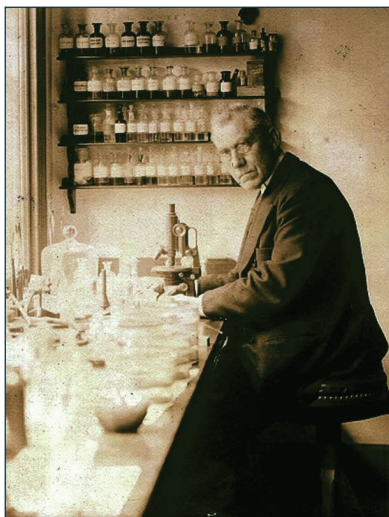
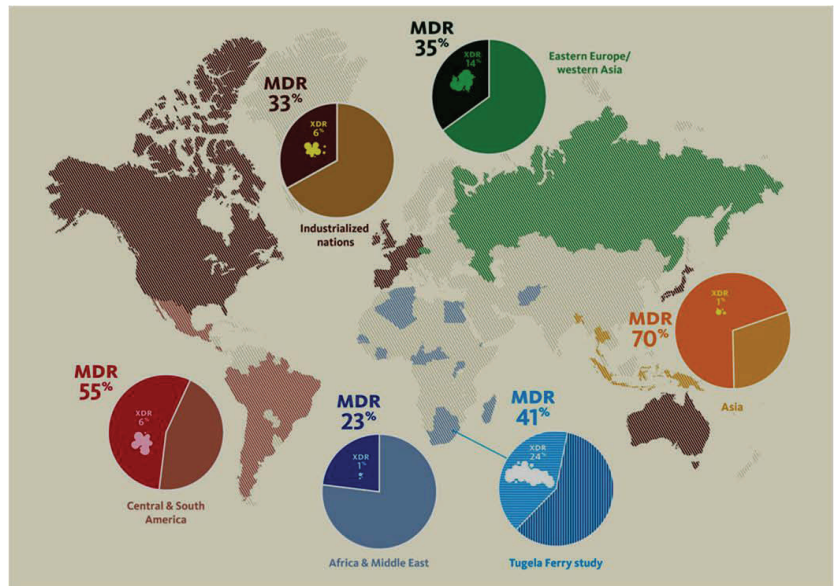


Hoewel de situatie in Nederland nog goed onder controle is, sterven er jaarlijks wereldwijd meer dan 1,5

miljoen mensen aan deze ziekte. Ik wil hier geen doomsenario schetsen, al leert de ervaring dat het schetsen van doomsenario's goed kan zijn voor het verkrijgen van onderzoeksgelden, maar tuberculose is wel een dreiging die we serieus moeten nemen en nooit mogen onderschatten. Dit gezegd hebbende, moet ik helaas zelfs in het VUmc nog geregeld uitleggen waarom we aan deze ziekte te werken, terwijl we nauwelijks tuberculosepatiënten hebben. Maar laten we nu even terug gaan naar de vraag hoe het komt dat tuberculose zo moeilijk te behandelen is, en waarom ons lichaam zo slecht in staat is de tuberculosebacterie uit te schakelen.

Deze vragen intrigeerden mij enorm, en toen we in 2001 de nieuwe onderzoekslijn van de afdeling bespraken zag ik een mogelijkheid om hier aan te gaan werken.

Gelukkig waren mijn naaste collega's, Ferry Namavar en Ben Appelmeik, ook enthousiast, zodat we samen ons afdelingshoofd Christina Vandenbroucke-Grauls van deze nieuwe richting konden overtuigen.



Andere onderzoekers waren minder enthousiast, de bekende microbioloog Martinus Beijerinck had ooit al geschreven; “geen onaangenamer studie voor den microbioloog dan die van den tuberkelbacil”. En tijdens het eerste tuberculosecongres dat ik bijwoonde, werd ik door een bekende collega voor gek verklaard dat we, zonder een achtergrond in het tuberculose veld, hier aan durfden te gaan werken.

Gelukkig bevonden we ons wat dat betreft wel in goed gezelschap, de al eerder genoemde Selman Waksman was ook blanco in het tuberculose onderzoek gestapt, en achteraf beschouwde hij dit als zijn grootste voordeel. De aarzelingen van andere onderzoekers zijn ook wel begrijpelijk, de tuberculosebacterie is zeer ongewoon en moeilijk te bestuderen. Als we het commentaar van Martinus Beijerinck over het tuberculose onderzoek verder volgen, lezen we: “de vindplaats van de tuberkelbacil is weerzin-

wekkend, de systematische verwantschap twijfelachtig, de groei traag, de cultuur moeilijk, de noodzakelijke proeven op dieren treurig en, geheel ten onrechte door een deel van het publiek afgekeurd en veracht”. Voor een groot deel kloppen deze woorden nog steeds, en in die ongewone eigenschappen van de tuberculosebacterie ligt ook voor een belangrijk deel de oorzaak van het probleem. Laten we daarom nu eerst in meer detail kijken naar deze bacterie.

Qua uiterlijk is de tuberculosebacterie gewoontjes, een staafvormige bacterie met een, voor een bacterie, normale afmeting van ongeveer 3 duizendste millimeter. Echter, schijn bedriegt, ondanks deze uiterlijke gelijkenis zijn de genetische en biochemische eigenschappen van de tuberculosebacterie heel anders dan

die van bijvoorbeeld de veel bekendere *Escherichia coli* bacterie. Deze twee bacteriën verschillen in feite meer van elkaar dan een mens en een willekeurige tuinplant. Hierdoor moeten we voor de tuberculosebacterie heel veel zaken weer opnieuw ontdekken.

De tuberculosebacterie is dus niet nauw verwant met meer bekende bacteriën, maar waarmee dan wel? *Mycobacterium tuberculosis* is het meest verwant aan onschuldige grondbacteriën, sommige bacteriën van zijn orde hebben ons zelfs antibiotica geschonken zoals de grondbacterie *Streptomyces griseus* waaruit Selman Waksman streptomycine isoleerde. Kennelijk is er in een grijs verleden een tak van deze bodembewoners afgesplitst, die zich heeft ontwikkeld tot gevaarlijke en taaie ziekteverwekkers, waaronder, naast de tuberculosebacterie, ook de lepra bacterie en de verwekker van tuberculose bij het rund.

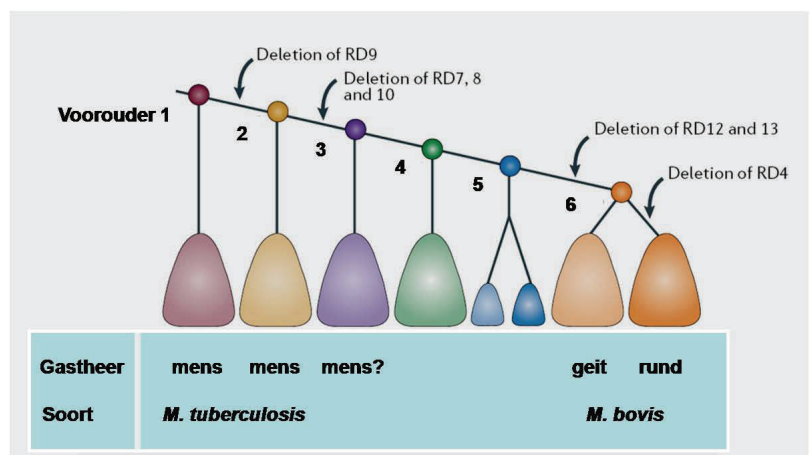
Het feit dat koeien ook tuberculose kunnen krijgen leidde al snel tot de theorie dat de mensheid tuberculose heeft opgelopen na de domesticatie van de koe, zo'n 8,000 jaar geleden. Een dergelijke overdracht noemen we een zoönose. Dit komt vaker voor, denk bijvoorbeeld weer aan HIV virus, dat, volgens de laatste schattingen, ongeveer rond 1920 de oversprong heeft gemaakt van aapachtigen naar de mens. Echter in

het geval van tuberculose is deze theorie duidelijk een geval van antropocentrisme gebleken. De mens ziet zichzelf graag als middelpunt en als slachtoffer. Uit recent genetisch onderzoek door Roland Brosch van het Institut Pasteur uit Parijs komt een heel ander beeld naar voren: de humane vorm van tuberculose blijkt namelijk veel ouder dan de koeientuberculose en daarom is het zeer onwaarschijnlijk dat de tuberculosebacterie van koe naar mens is overgesprongen. Het omgekeerde zou nog wel waar kunnen zijn.

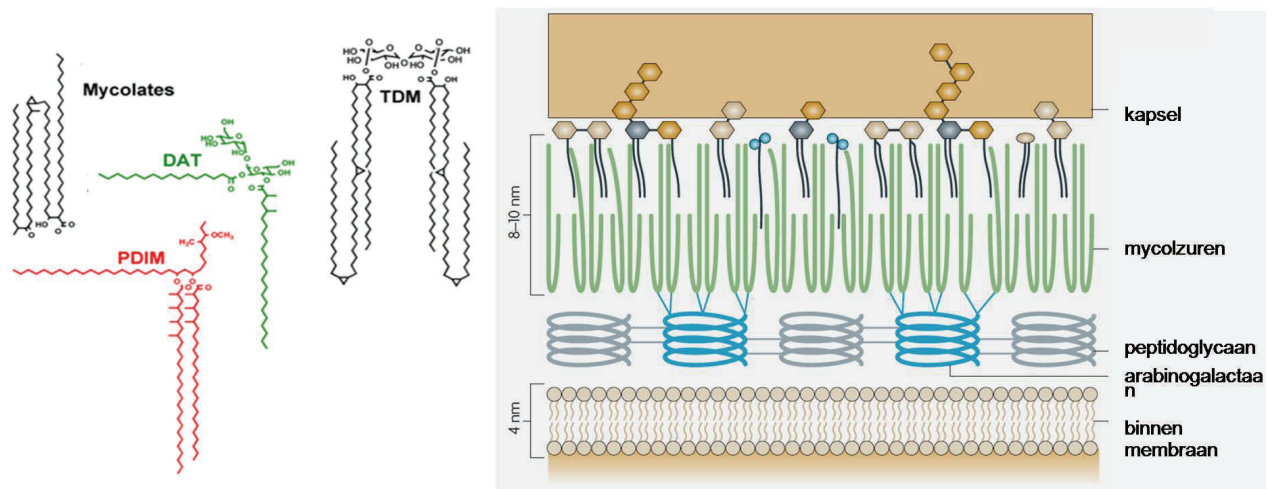


Hierbij moet wel gezegd worden dat de koe op haar beurt wel het nodige terug heeft gedaan, tuberculose bacteriën nestelen zich namelijk graag in melkklieren en tot de helft van de vorige eeuw zijn veel mensen juist weer ziek geworden door het drinken van met koeien-tuberculose besmette melk. Dit betekent dat de oorsprong van humane tuberculose nog steeds niet bekend is, maar genetisch onderzoek laat zien dat tuberculose een hele oude ziekte is en dat de bron waarschijnlijk in Oost Afrika ligt, net als de oorsprong van de mens.

Het duidelijkste verschil tussen de tuberculosebacterie en gewone bacteriën ligt in de celenvolpe, de laag die de bacterie afscheidt en beschermt tegen de buitenwereld. De celenvolpe van de tuberculosebacterie is absoluut uniek en een waar paradijs voor chemici. Deze celenvolpe bestaat uit een dubbele membraan, die samen een zeer ondoor-

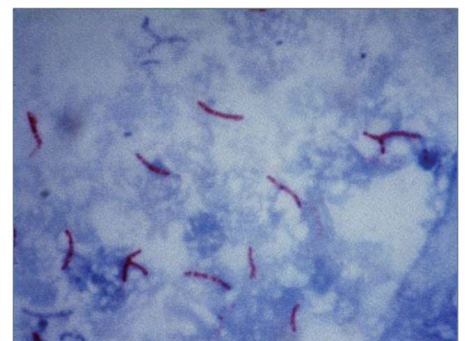


dringbare laag vormt. Deze laag is bijvoorbeeld 100 maal minder doorlaatbaar dan die van de *E. coli* bacterie. De buitenste celmembraan is opgebouwd uit een reeks exotische vetten of lipiden die tot nu toe vrijwel nergens anders zijn gevonden.



In het figuur hierboven ziet u een klein aantal van de meer dan 70 verschillende soorten lipiden die voorkomen bij de tuberculosebacterie. Ook als u geen chemicus bent, zult u de buitenissigheid van deze lipiden kunnen herkennen. Helemaal als ik daar nog bij vertel dat bij zo ongeveer elke andere levensvorm de lipiden zich vrijelijk kunnen bewegen in de celmembraan. Echter, bij de tuberculosebacterie doet zich de uitzonderlijke situatie voor dat een aantal van deze lipiden verankerd zijn en daarmee volstrekt unieke eigenschappen aan deze celmembraan geven. Deze ondoordringbare laag is er deels de oorzaak van dat de tuberculosebacterie traag groeit, maar ook dat hij ongevoelig is voor veel verschillende soorten antibiotica. Deze antibiotica kunnen niet, of heel slecht, doordringen tot het binnenste van de bacterie. Deze bacterie groeit dus niet alleen langzaam, hij gaat ook langzaam dood. ‘ Die hard ’ zou dan ook de Engelse titel geweest zijn voor mijn oratie. De bijzondere celenvolpe van de tuberculosebacterie werd al opgemerkt door Robert Koch. De gebruikelijke bacteriekleuringen schoten namelijk tekort om de oorzaak van tuberculose aan tonen. Robert Koch heeft toen een nieuwe kleurmethode ontwikkeld die specifiek was voor tuberculose bacteriën. Kort na zijn publicatie is deze methode nog iets verbeterd, en wordt nu nog steeds gebruikt voor de diagnostiek onder de naam Ziehl-Neelsen kleuring.

Een ondoordringbare celwand is een uitstekend verdedigingsmiddel om ervoor te zorgen dat er geen ongewenste stoffen naar binnen kunnen komen, maar wat als je als bacterie nu stoffen naar buiten wilt transporteren?



Oftewel, een beschermend harnas is heel prettig in de strijd, maar minder prettig als je naar het toilet moet! De meeste ziekteverwekkende bacteriën transporteren een groot aantal eiwitten naar buiten, die nodig zijn om de werking van het immuunsysteem te blokkeren of voor de aanhechting aan de juiste gastheercellen. Deze uitgescheiden of gesecreteerde eiwitten zijn over het algemeen groot en wateroplosbaar en zijn dus niet makkelijk over een celmembraan te transporteren.

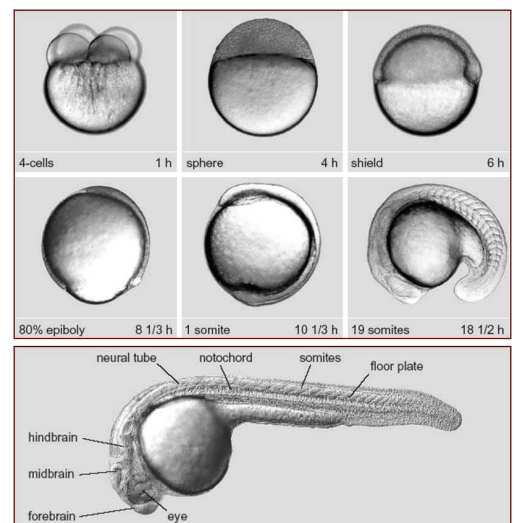
Gewone bacteriën hebben daarom verschillende eiwit secretiesystemen ontwikkeld om deze eiwitten toch naar buiten te brengen zonder dat er gaten vallen in hun celenveloppe. Tot nu toe zijn er een zestal van die secretiesystemen ontdekt, genoemd type I tot en met type VI. Uit genomische analyse weten we dat de tuberculosebacterie geen enkele van deze eiwit secretiesystemen heeft. Omdat deze bacterie ook nog eens een volstrekt ondoorlaatbare celenveloppe bezit werd lange tijd gedacht dat de tuberculosebacterie maar weinig of misschien zelfs helemaal geen eiwitten zou uitscheiden. Men vermoedde dat alle interacties met de gastheer zouden lopen via de bijzondere lipiden van de celwand. Onderzoek, waaronder dat van Ben Appelmeijer en Theo Geijtenbeek, liet inderdaad zien dat een aantal van die glycolipiden een bijzondere interactie hadden met het immuunsysteem. Echter, dat deze bacterie helemaal geen eiwit zou uitscheiden leek mij een onmogelijkheid. Vanaf het begin heeft ons onderzoek zich dus gericht op het vinden en aantonen van een eiwit secretiesysteem. Maar om dat te kunnen doen, moesten we eerst een tuberculose laboratorium inrichten en een modelsysteem voor het onderzoek opzetten.

Mijn co-promoter, Jan Tommassen, had mij ooit een tijdschrift gegeven waarin een artikel stond dat ik absoluut moest lezen. Eerlijk gezegd kan ik me niet meer herinneren waar het desbetreffende artikel over ging (sorry Jan), maar op de laatste pagina gekomen zag ik het daarop volgende artikel dat me wel is bijgebleven! Een toevallige gebeurtenis die tegenwoordig, met enkel nog PDFjes, niet snel meer zal gebeuren.

In dit 2^e artikel werd beschreven hoe tuberculose bestudeerd kon worden met behulp van goudvissen. Goudvissen en andere koudbloedige dieren kunnen namelijk ook tuberculose krijgen, niet van *Mycobacterium tuberculosis*, maar van een nauw verwante soort, *Mycobacterium marinum*. Deze bacterie veroorzaakt tuberculose bij vissen maar heeft als voordeel dat hij veel minder schadelijk is voor mensen, en dus ook voor wetenschappers. Daarnaast groeit deze bacterie ook nog eens veel sneller. Dit betekent dat wij met vissterculose vier keer zoveel proeven kunnen doen in dezelfde tijd. Zowel deze beide bacteriën als de beide ziektebeelden lijken voldoende op elkaar om te verwachten dat veel van onze bevindingen ook waar zijn voor de humane tuberculose. Om de ziekteverwekkende eigenschappen van deze bacterie te bestuderen hadden we nog wel een proefdiermodel nodig. Dierproeven zijn helaas noodzakelijk om tuberculose te begrijpen. Dit komt omdat we gedurende een langere periode de interactie met cellen van het immuunsysteem moeten bestuderen. Hiervoor kozen we niet de goudvis, maar de zebravis, een populair proefdier bij ontwikkelingsbiologen.

Een extra voordeel van de zebravis is dat we ook experimenten met zebravis embryo's konden uitvoeren. Deze zijn doorzichtig, wat het mogelijk maakt om de gedragingen van individuele fluorescerende bacteriën in een levende gastheer volgen. Hiermee kunnen we proeven die in muizen een half jaar duren vaak terug brengen tot een week.

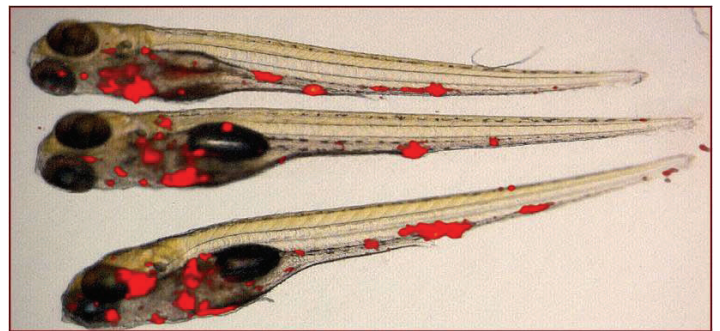
Zelf had ik echter totaal geen ervaring met vissen, ik heb zelfs nooit een guppy verzorgd of met een hengel langs de waterkant gezeten. Daarom zocht ik iemand die er wel verstand van had en die bovendien bereid was het avontuur aan te gaan, want in die tijd werd dit infectiemodel nog nergens anders gebruikt. Astrid van der Sar was die avontuurlijke postdoc en zij is sindsdien verant-



woordelijk voor het vissengebeuren op de afdeling, daarbij geholpen door de steun en inventiviteit van Wim Schouten. Al snel bleek het model een gouden greep, inmiddels zijn er wereldwijd steeds meer onderzoeksgroepen die zebravissen als infectiemodel gebruiken. Er is zelfs een tweejaarlijkse bijeenkomst op dit gebied. Hierdoor komen er ook meer mogelijkheden, zoals interessante zebravis mutanten en zebravis met fluorescente celmarkers.

De groep van Herman Spaink uit Leiden heeft onlangs een automatisch injectieapparaat gemaakt voor zebravis embryo's, waardoor we straks in staat zijn om op grote schaal nieuwe antibiotica te testen. Het is mijn overtuiging dat het gebruik van zebravissen een ethisch en wetenschappelijk verantwoord model is voor tuberculose onderzoek in muizen. Helaas moeten we zo af en toe nog wel klassieke tuberculose onderzoekers overtuigen van de kracht van dit model.

Zij vergeten kennelijk dat de kortste route niet altijd de snelste is. Als je een modelsysteem gebruikt, moet je uiteraard op een gegeven moment de belangrijkste proeven herhalen voor de echte tuberculosebacterie. Tot voor kort deden we dat in Leiden bij Tom Ottenhoff, maar sinds een paar maanden hebben we, mede dankzij Jovanka Bestebroer, zelf ook een laboratorium voor tuberculose onderzoek.



Nu we een geschikt infectiemodel hadden moesten we nog de erfelijke eigenschappen van de bacterie gericht kunnen veranderen. Dit is absoluut geen sinecure bij de tuberculosebacterie, door zijn ondoordringbare celwand weigert hij DNA op te nemen en als dat dan eindelijk wel lukt, leidt het eigenlijk nooit tot het gewenste resultaat, namelijk een gerichte mutatie. Door de ontwikkeling van een aantal genetische trucs met gebruik van bacterievirussen en vooral dankzij de expertise en het geduld van Roy Ummels hebben we de genetisch manipulatie van tuberculose nu redelijk onder controle. Tijd om op zoek te gaan naar basis van de ziekteverwekkende eigenschappen.

Esther Stoop en Gunny van de Brink nemen hiervoor de directe benadering, zij maken bacteriemutantanten en bestuderen vervolgens welke nog in staat zijn de zebravis te infecteren. Dat is monnikenwerk, maar dankzij ons nieuwe infectiemodel is het mogelijk. Deze benadering heeft al enkele nieuwe en veelbelovende mutantanten opgeleverd die nu verder uitgewerkt worden. Het is onze hypothese (en hoop) dat de analyse van deze mutantanten een bijdrage gaat geven aan de ontwikkeling van een vaccin tegen tuberculose.

Maar zoals ik al eerder aangaf waren we vooral geïnteresseerd in eiwitsecretie, en dan met name secretie van eiwitten belangrijk zijn tijdens de infectie. Voor deze zoektocht zijn we uitgegaan van een heel speciale groep eiwitten, de PE en PPE eiwitten, die, net zoals veel van de lipiden, uniek zijn voor *Mycobacterium*.

Hun functie is nog steeds onduidelijk, maar wat wel duidelijk is, is dat tuberculosebacteriën er wel heel erg veel hebben, ze besteden er bijna 10% van hun genoom aan. Aangezien bacteriën, en zeker ziekteverwekkende bacteriën, zeer zorgvuldig omgaan met hun erfelijk materiaal en geen overbodige ballast bij zich dragen, moeten deze eiwitten wel een belangrijke rol vervullen en wij dachten dat deze rol de interactie met het immuunsysteem was. Abdallah Abdallah, Fredericke Hannes en Theo Verboom lieten al snel zien dat deze eiwitten inderdaad gesecreteerd worden.

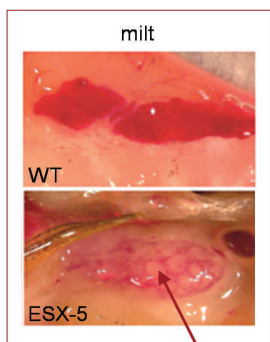
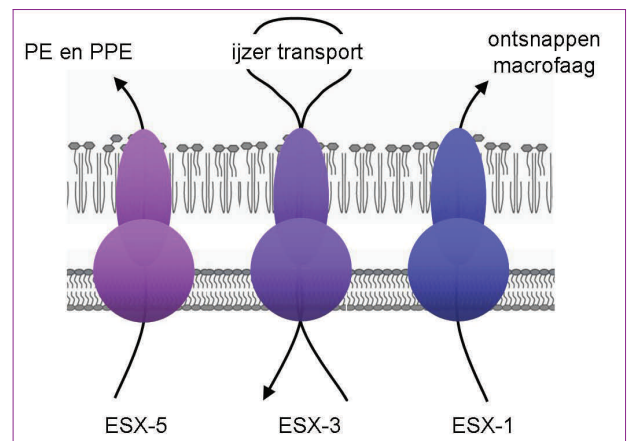
Na het testen van veel mutantanten vonden ze ook het secretiesysteem waardoor deze eiwitten uitgescheiden

worden. Zoals ik al eerder vertelde zijn er zes verschillende eiwit secretiesystemen in bacteriën bekend, die allemaal niet voorkomen in de tuberculosebacterie. Het systeem dat hier ontdekt was, bleek inderdaad een nieuw secretiesysteem te zijn en hebben we, in een vlaag van creatieve inspiratie, type VII genoemd. Dit systeem is betrokken bij de secretie van veel verschillende PE en PPE eiwitten, bij elkaar waarschijnlijk meer dan 100. Echt een secreteet.

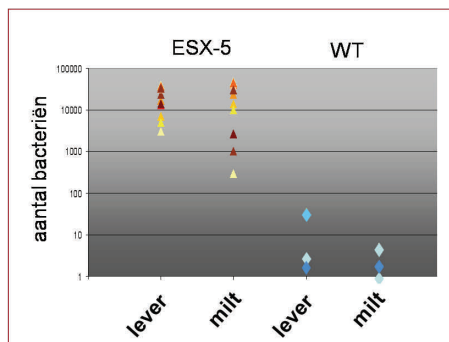
Vervolgens bleek de secretie bij tuberculose bacteriën nog omvangrijker dan we in eerste instantie dachten. Deze bacterie blijkt namelijk niet één type VII secretiesysteem te hebben, maar meerdere, elk met een eigen functie. Een 2^e type VII secretiesysteem is essentieel voor ijzeropname, terwijl een derde systeem misschien wel de belangrijkste van allemaal blijkt te zijn. Nicole van der Wel en Peter Peters van het NKI hebben laten zien dat dit systeem er voor zorgt dat de tuberculosebacterie kan ontsnappen aan de dodelijke wapens van de macrofaag. De macrofaag is de schildwacht van ons immuunsysteem, maar tegelijkertijd ook de cel waarin de tuberculosebacterie kan overleven en zich kan vermenigvuldigen, dankzij type VII secretie.

Intussen weten we, dankzij Eveline Weerdenburg en wederom Abdallah en Jovanka, ook iets meer over de functie van de PE en PPE eiwitten. Als de secretie van deze eiwitten geblokkeerd wordt blijkt de tuberculosebacterie niet meer goed in staat om het immuunsysteem te manipuleren. En dat geldt zowel voor de vissenvariant als voor *Mycobacterium tuberculosis* zelf. Wanneer de bacterie de PE en PPE eiwitten niet meer uitscheidt, zien we in de gastheer een dramatische verandering in de productie van een aantal cytokines, de immuunboodschappers. Even hadden we de droom dat we met deze mutant een interessante vaccinkandidaat in handen hadden. Hoewel de *in vitro* infectie experimenten met macrofagen en zebrafish embryo's dit beeld ondersteunden, zagen we bij volwassen vissen echter een heel ander beeld. Daar leidde de veranderde immuunrespons niet tot een snellere uitschakeling van de tuberculosebacterie. Integendeel, we vonden een enorme toename van het aantal bacteriën en ook een snelle ontwikkeling van granulomen.

Dit zijn de infectiehaarden waar tuberculose zich kan handhaven en vermeerderen. Dit alles leidde ertoe dat de zebrafissen 2 tot 4 maal zo snel dodelijk ziek werden, niet echt een goede eigenschap voor een



granulomen



vaccinstam. Kennelijk heeft de tuberculosebacterie niet één, maar meerdere verdedigingsmechanismen opgebouwd die het immuunsysteem kunnen weerstaan en manipuleren.

Een goedwerkend vaccin tegen tuberculose zou natuurlijk mooi zijn, maar is wellicht een ijdele hoop. Tuberculose is namelijk anders dan veel andere infectieziekten. Als je bijvoorbeeld eenmaal mazelen hebt doorgemaakt ben je levenslang beschermd tegen deze ziekte, daarom kun

je tegen mazelen goed vaccineren. Zo niet bij tuberculose, een doorstane infectie geeft nauwelijks bescherming. Het huidige tuberculose vaccin, BCG, beschermt volwassenen dan ook niet goed tegen longtuberculose. Toch is men er nooit in geslaagd om dit vaccin uit 1921 echt te verbeteren.

Dramatischer is nog dat recent onderzoek er op wijst dat tuberculose juist herkend wil worden door het immuunsysteem. De meeste ziekteverwekkende bacteriën en virussen veranderen geregeld bepaalde oppervlaktekenmerken, de zogenaamde epitopen, waardoor ze kunnen ontsnappen aan ons immuunsysteem. Het griepvirus is hier een goed voorbeeld van, en daarom moet je hier ieder jaar opnieuw tegen gevaccineerd worden. Analyse van de genetische variatie bij verschillende tuberculose stammen laat zien dat deze epitopen nu juist de meest geconserveerde delen van de bacterie zijn.

Oftewel, hij lijkt dus juist herkend te willen worden door het immuunsysteem. Maar hoe kan dit nu gunstig zijn voor een bacterie?

Het oproepen van een immuunrespons leidt als het goed is namelijk tot uitschakeling van de bacterie! Maar niet bij tuberculose, hij kan goed overleven in de eerste cellen van het immuunsysteem die hij tegenkomt, de macrofaag. Een infectie van de macrofaag leidt vervolgens tot een groepering van verschillende immuuncellen en tot de vorming van een granuloom, ook wel tuberkel genoemd.

Daarbinnen kan de bacterie zich, onder de juiste condities, goed handhaven en in sommige gevallen sterk vermenigvuldigen. Na het openbreken van een dergelijk granuloom kan de bacterie zich verspreiden naar een nieuwe gastheer. De

consequentie hiervan is dat de meeste vaccins wellicht niet zullen werken omdat de tuberculosebacterie juist activatie van het immuunsysteem nodig heeft.

Maar hoe moeten we tuberculose dan bestrijden? Wat in ieder geval gelukkig wel werkt zijn antibiotica. Zoals ik eerder in deze rede vertelde ontstaan er echter in toenemende mate resistente varianten van de tuberculosebacterie. We hebben dus nieuwe antibiotica nodig, en gelukkig

zijn er een aantal daarvan in ontwikkeling. Misschien kunnen we ook onze kennis over het type VII secretiesysteem hiervoor gebruiken. We hebben gezien dat de tuberculosebacterie over verschillende type VII secretiesystemen beschikt, die betrokken zijn bij belangrijke functies voor de bacterie.

Wat we nu willen doen is deze systemen in detail onderzoeken en kijken of we de werking van al deze systemen tegelijk kunnen blokkeren. Maria Daleke heeft de laatste jaren bijvoorbeeld onderzocht hoe eiwitten naar het type VII systeem gebracht worden, en ze heeft gevonden dat een klein stukje eiwit aan het uiteinde

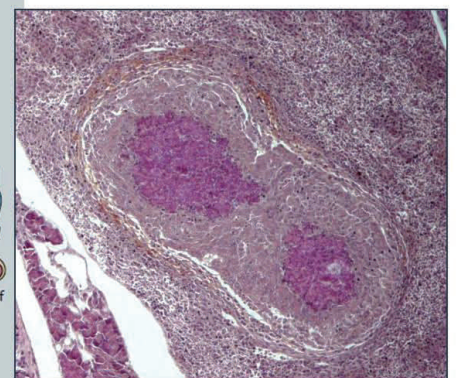
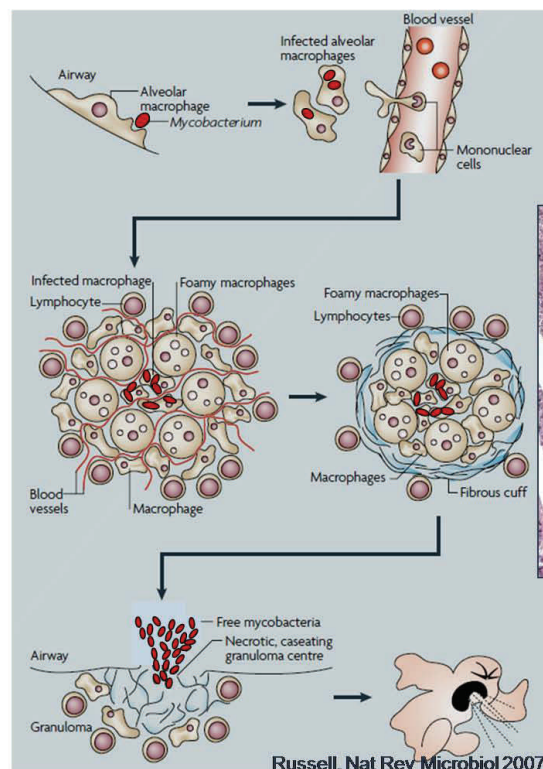


Foto: Eveline Weerdenburg

de van PE eiwitten hiervoor noodzakelijk is.

Nu willen we weten welk eiwit dit secretiesignaal herkent en hoe deze interactie precies verloopt. Edith Houben heeft de immense taak op zich genomen om de samenstelling van het type VII secretiesysteem te ontrafelen. Zij heeft na jarenlang toegewijd onderzoek dit systeem in voldoende mate uit de bacterie kunnen isoleren en daardoor weten we nu welke eiwitten de basis van het Type VII secretiesysteem vormen.

Met behulp van de elektronenmicroscopie weten we nu bijna hoe dit secretiesysteem er uit ziet. De volgende stap is dan om een stof te vinden die type VII secretiesystemen blokkeren. Als dit lukt, dan stellen we de tuberculosebacterie voor een groot probleem.

Zoeken naar nieuwe antibiotica is moeilijk, het vraagt veel en uitgebreid onderzoek, terwijl het overduidelijk belang om zuinig om te springen met het gebruik van antibiotica strijdig is met de commerciële belangen van de farmaceutische industrie. Daarnaast is dit onderzoek ook vanuit wetenschappelijk oogpunt niet altijd even aantrekkelijk, zo zijn de resultaten vaak lastig in de hoger aangeschreven bladen te publiceren. Dit leidt tot verminderde interesse bij de onderzoekers. Dat werd mij ook duidelijk bij het organiseren van de nieuwe voorjaarsvergadering voor de medische

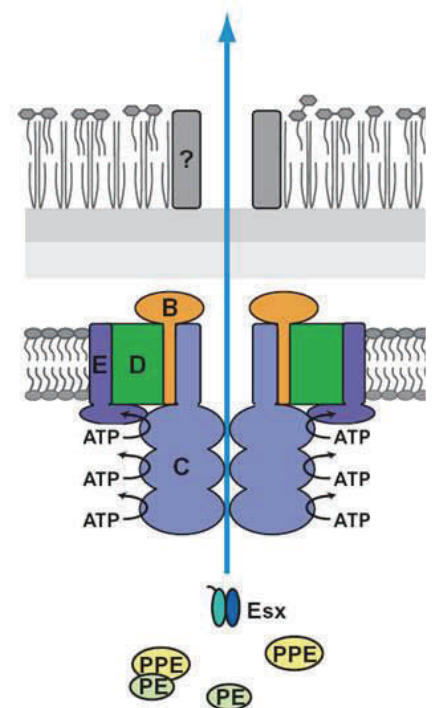
en algemene microbiologie. Terwijl we vele tientallen uittreksels kregen over het bestuderen en in kaart brengen van resistente bacteriën, was er eigenlijk geen enkele over mogelijke nieuwe antibiotica. Als we op deze voet doorgaan hebben we straks uitstekend in beeld gebracht waar de dijken zwak zijn en waar de resistente bacteriën ons met een vloedgolf bedreigen, maar er niet voor gezorgd dat de dijken ook daadwerkelijk verhoogd worden.

In vogelvlucht heb ik tot nu verteld over ons tuberculose onderzoek, waarbij nog een onderzoekslijn ontbreekt. We zijn onlangs namelijk begonnen aan een nieuwe richting waarbij we niet kijken naar de gesecreteerde eiwitten, maar naar eiwitten die voorkomen in de celmembranen. Het gaat om eiwitten die er voor zorgen dat de celenveloppe van de tuberculosebacterie goed kan functioneren. Van deze eiwitten weten we eigenlijk nog maar schrikbarend weinig, maar in principe zouden het goede kandidaten zijn voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. Aniek van der Woude heeft een procedure ontwikkeld om deze eiwitten specifiek te isoleren. Vervolgens hebben we, dankzij de samenwerking met Connie Jiménez van het Proteomics Center, kunnen bepalen welke eiwitten dit zijn. Nu kunnen we de functie van deze eiwitten meer in detail gaan bestuderen.

Met al deze onderzoekslijnen hopen we niet alleen een goed beeld te krijgen van de eigenschappen van deze bacterie, maar ook tegelijkertijd ideeën te krijgen over mogelijke oplossingen. Martinus Beijerinck, die eerder zo negatief was over de tuberkel bacil, sloot zijn stukje af met de zin: "de eenige lichtstraal in de duistere geschiedenis van dit voorwerp der ontzetting is de gerechtigde hoop op het verdwijnen daarvan door de samenwerking van alle wetenschappen."

En als we alles weten over tuberculose, wat dan? Afgezien van de vraag of dat mogelijk is, is het denk ik wel belangrijk om te kijken naar het bredere toekomstperspectief voor de microbiologie.

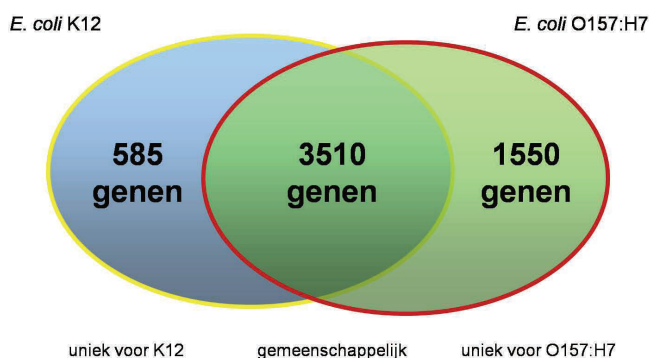
Er zijn veel biologen die denken dat we microbiologie ontgroeid zijn, omdat we bacteriën en virussen nu wel



begrijpen en naar interessantere problemen toe moeten, zoals de werking van ons brein of hoe we ons ontwikkelen uit een enkele cel. Een hoogleraar celbiologie verwoordde dit door te stellen dat een bacterie een zakje met vloeistof is, niets meer en niets minder. Als microbioloog ben ik het uiteraard hier hartgrondig mee oneens, hoewel de microbiologie deze minachting misschien ook wel deels aan zichzelf te wijten heeft.

De microbiologie heeft zich, toen eind jaren zeventig de onbegrensde mogelijkheden van de recombinant DNA technologie zichtbaar werden, voornamelijk bezig gehouden met modelorganismen zoals *E. coli* K12. Hoewel dit een heel logische en juiste beslissing was en *E. coli* ook nu nog zeer belangrijk is hebben we als microbiologen te laat de overstap gemaakt naar andere organismen. Hierdoor is er een eenzijdig beeld van de microbiologie ontstaan. Wat we moeten laten zien is dat de microbiologie veel meer is dan die ene bacterie.

Dit 'meer' is al te zien als we een heel klein beetje verder kijken dan *E. coli* K12, namelijk naar alle *E. coli*'s. *E. coli* K12 heeft zelf iets meer dan 4,000 genen. Hij is dus in staat meer dan 4,000 eiwitten te maken met een verschillende functie. Dit lijkt vrij weinig in verhouding tot

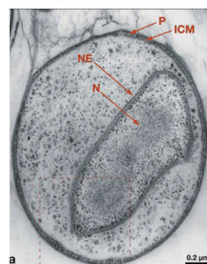


het humane genoom, met ongeveer 23,000 genen. Dit getal wordt echter pas echt indrukwekkend als we de genoomsequenties van meerdere *E. coli* stammen met elkaar vergelijken. Bij mensen zijn er maar een 100-tal genen die sterk kunnen veranderen. Echter, als we twee *E. coli* stammen met elkaar vergelijken kunnen er wel meer dan 1,000 genen totaal verschillend zijn. En als we al die verschillende genen uit al die *E. coli* stammen bij elkaar optellen blijkt dat *E. coli* als soort meer genen heeft dan de mens!

Maar er is meer. Zoals ik al eerder vertelde is de genetische afstand tussen *E. coli* en de tuberculosebacterie enorm. Dit is niet uniek binnen het bacterierijk, er zijn exotische bacteriesoorten die leven in de diepzee, in heet waterbronnen, in de aardbodem, of gewoon in onze darmen.

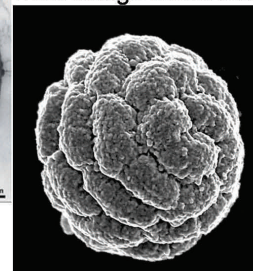
Er zijn bacteriën met eigenschappen die we vroeger onmogelijk hielden voor bacteriën, zoals bacteriën met een celkern, bacteriën die op andere bacteriën jagen, bacteriën die als meercellig organisme door het leven gaan, of bacteriën die andere bacteriën opnemen. In het kleine is er nog een hele wereld te ontdekken. De verscheidenheid aan bacteriën is niet alleen een rariteitenkabinet, maar kan ook wel degelijk gebruikt om wetenschappelijke en maatschappelijke problemen op te lossen.

bacteriën met kern



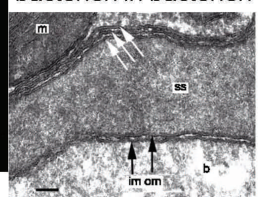
Fuerst, Annu Rev Microbiol 2005

meercellige bacteriën



Abreu et al., IJSEM 2007

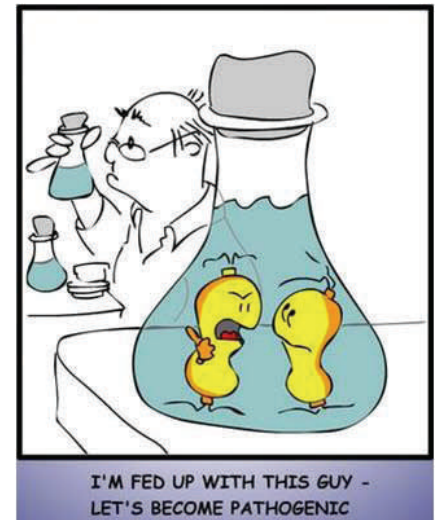
bacteriën in bacteriën



Von Dohlen, Nature 2001

Een vraag die mij persoonlijk erg boeit is de evolutie van bacteriën. Hoe evolueert een langzaam groeiende groundbacterie met een bijzondere celenveloppe tot een groep met zeer gevaarlijke ziekteverwekkende bacteriën?

Wat maatschappelijke problemen betreft denk ik, naast medisch onderzoek, vooral aan milieuverontreiniging en alternatieve brandstoffen. Op het gebied van medisch onderzoek moeten we proberen infectieziekten continu een stap voor te blijven, wat een hele uitdaging is. Daarnaast kunnen we wellicht bacteriën ook gebruiken voor andere aandoeningen. Het tuberculosevaccin BCG wordt bijvoorbeeld nu al gebruikt voor de behandeling van blaastumoren en de komende jaren gaan we onderzoeken of we BCG nog verder kunnen verbeteren. Voor wat betreft de andere toepassingen is het van belang te weten dat de metabole capaciteit bij bacteriën bijna onbegrensd is en deze kan, door slim onderzoek, in ons voordeel gebruikt worden om verschillende soorten afval op te ruimen. Een voorbeeld uit de natuur is het opruimen van olieafval, het feit dat de ramp in de golf van Mexico niet veel groter is hebben we te danken aan een leger aan micro-organismen die de olie te lijf gingen. Ook de groot-schalige productie van alternatieve brandstoffen door genetisch verbeterde bacteriën of algen is een reële mogelijkheid. Dit zijn twee gebieden waar de microbiologie een grote bijdrage zou kunnen leveren aan de maatschappij, mits we zowel geldverstrekkers als studenten blijven interesseren voor deze tak van wetenschap. In dat laatste heb ik alle vertrouwen, als ik zie hoe de microbiologie weer leeft bij nieuwe generaties studenten en promovendi. De financiering van wetenschappelijk onderzoek vormt echter een groter probleem. Ik hoop dat de politiek in staat is zich los te maken van de waan van de dag en richting gaat geven aan structureel wetenschapsbeleid over langere periode. Hierbij moeten dan wel de universiteiten een vooraanstaande rol spelen, want alleen daar kruisen de paden van wetenschappelijk onderwijs en onderzoek, wat nodig is voor de opleiding van nieuwe generaties onderzoekers.



Mijn voorliefde voor de wetenschap en de microbiologie komt niet uit de lucht vallen, ik heb het voorrecht gehad om samen te werken en geïnspireerd te worden door een aantal goede leermeesters. Ten eerste zijn dat Peter Weisbeek en Jan Tommassen, die 'het' in mij zagen zitten en me een promotieplaats hebben gegeven. Vier jaar lang werd mijn leven beheerst door *Pseudomonas* en zijn ijzeropnamesysteem. Toen is ook mijn fascinatie voor de celenveloppe ontstaan. Na mijn promotie heb ik onderzoek gedaan aan de slaapziekte parasiet onder de hoede van Piet Borst, niet alleen een uitstekende wetenschapper, maar ook een hele goede mentor. Na enkele jaren opnieuw in Utrecht te hebben gewerkt, verkaste ik naar het VUmc, waar ik Christina en Ben ontmoette. Ben is naast een goede leermeester ook een hele fijne collega en vriend. Ik hoop dat dat nog jaren zo blijft. Christina wil ik bedanken voor haar onvoorwaardelijke enthousiasme voor de fundamentele wetenschap en haar positieve manier van leidinggeven.

Tenslotte is daar nog het onderzoeksteam, de meesten daarvan heb ik al genoemd, alleen het Pseudomonasteam heb ik helaas moeten overslaan, maar uiteraard wil ik ook Marian Llamas en Marlies Mooij bedanken voor hun mooie onderzoek. Ik denk dat we met zijn allen een mooie prestatie leveren op het snijvlak van moleculaire en medische microbiologie. Naast wetenschappers heb je ook een goede infrastructuur

nodig, daarom wil ik hier ook speciaal Wim, Sandra Thonhauser en iedereen van het management en de bacteriologische keuken bedanken voor al hun ondersteunende werk.

Hoewel we zoveel mogelijk expertise in eigen huis willen hebben, zijn goede samenwerkingen ook essentieel. De belangrijkste daarvan heb ik tijdens mijn rede al genoemd, behalve één. Tijdens de eerste jaren aan het myco-onderzoek is een hechte en vruchtbare band ontstaan met de groep van Joen Luijck en Bauke Oudega van de VU. Waar ik toch vaak meer de genetische benadering zoek, is Joen meer biochemicus met een goede eiwit-techniek, en dat is een uitstekende combinatie. Vanuit die samenwerking is ook het idee ontstaan om onze twee groepen nog meer naar elkaar toe te laten groeien.



Joen is de grote inspirator geweest van mijn dubbelaanstelling bij de VU en het VUmc. Gelukkig konden Bauke, Christina en de verschillende benoemingscommissies zich ook helemaal vinden in dit idee. Ik ben nu ruim een half jaar in deze nieuwe functie aan de slag en merk al dat de interactie succesvol is, niet alleen hebben we nu veel meer borrels en gezellige BBQs in het Amsterdamse bos, maar op wetenschappelijk gebied is er ook al de nodige kruisbestuiving. Het is de bedoeling om herkenbare en brede microbiologische afdeling te vormen waarin excellent onderzoek en onderwijs plaatsvindt. Hierbij wil ik ook graag het college van Bestuur van de Vrije Universiteit en de Raad van Bestuur van het VUmc bedanken voor deze benoeming en het in mij gestelde vertrouwen

En dan is er natuurlijk ook nog een thuisfront. Naast mijn dierbare familie en vrienden zijn vooral vier heel belangrijke vrouwen in mijn leven die ik graag wil bedanken. Ten eerste mijn moeder, die mij, samen met Pa, altijd met veel liefde heeft opgevoed, maar van wie ik ook heb meegekregen dat je altijd moet kijken wat je voor anderen kan betekenen, misschien heeft dat wel een rol gespeeld in de keuze voor het tuberculose onderzoek. Dan onze beide dochters, ook allebei hele bijzondere en lieve meiden en dat zeg ik geheel objectief. Al heel jong toonde ze interesse in de microbiologie. Ik weet nog dat ze een keer, op een leeftijd van twee en vier jaar, voor ons uit liepen, waarop Julia, de jongste, zei: “ik heb pijn aan mijn oor door, die stomme rotbacteriën”. Waarop Sanne antwoordde: “niet alle bacteriën zijn slecht hoor, er zijn ook een heleboel goede bacteriën”. Op dit moment is de interesse in microbiologie even verdrongen door andere zaken, zoals vriendinnen, sport en vooral allerlei digitale netwerken, maar wie weet.

Als laatste wil ik Fraukje bedanken, de liefde van mijn leven. Je bent mijn maatje, mijn klankbord, mijn thuis. Uit het feit dat onze trouwdag 24 maart is, tevens wereldtuberculose dag, mag u dan ook niet opmaken dat ik met mijn werk getrouwd ben. Dit, zoals vele dingen in het leven, berust louter op toeval. Ik hoop dat ik, ook in deze nieuwe functie, voor deze vrouwen altijd genoeg tijd kan vrij maken.

Tenslotte, twee weken geleden waren Fraukje en ik bij het tuberculosemuseum en leprozenhuis in Drenthe, en verbleven een nacht in de voormalige straffkolonie Veenhuizen. De huizen hadden daar stichtelijke namen zoals “Toewijding”, “Werk en Bid” en “Bitter & Zoet”. Welnu, dit was uw portie Bitter voor deze dag, het zoet volgt hierna op de receptie, maar wel met bittergarnituur, dat dan weer wel. Ik heb gezegd.



Referenties en aanbevolen literatuur

1. Abdallah, A.M. et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nature reviews. Microbiology* **5**, 883-91 (2007).
2. Carvalho, R. et al. A high-throughput screen for tuberculosis progression. *PloS One* **6**, e16779 (2011).
3. Comas, I. et al. Human T cell epitopes of Mycobacterium tuberculosis are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics* **42**, 498-503 (2010).
4. Dormandy, T. The White Death: A History of Tuberculosis. Hambledon Continuum (2001).
5. Gey Van Pittius, N.C. et al. The ESAT-6 gene cluster of Mycobacterium tuberculosis and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome biology* **2**, RESEARCH0044 (2001).
6. Kooyk, Y.V., Appelmelk, B. & Geijtenbeek, T.B.H. A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 153-159 (2003).
7. Lukjancenko, O., Wassenaar, T.M. & Ussery, D.W. Comparison of 61 sequenced Escherichia coli genomes. *Microbial ecology* **60**, 708-20 (2010).
8. Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G. & Besra, G.S. The methyl-branched fortifications of Mycobacterium tuberculosis. *Chemistry & Biology* **9**, 545-53 (2002).
9. Ryan, F. Tuberculosis: The Greatest Story Never Told - The Search for the Cure and the New Global Threat. Swift Publishers Ltd (1992).
10. Russell, D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology* **5**, 39-47 (2007).
11. Sani, M. et al. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathogens* **6**, e1000794 (2010).
12. Smith, N.H., Hewinson, R.G., Kremer, K., Brosch, R. & Gordon, S.V. Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 537-44 (2009).
13. Tobin, D.M. & Ramakrishnan, L. Comparative pathogenesis of Mycobacterium marinum and Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Microbiology* **10**, 1027-39 (2008).
14. van der Sar, A.M. et al. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of Salmonella typhimurium infections. *Cellular Microbiology* **5**, 601-611 (2003).
15. van der Sar, A.M., Appelmelk, B.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. & Bitter, W. A star with stripes: zebrafish as an infection model. *Trends in Microbiology* **12**, 451-7 (2004).
16. van der Wel, N. et al. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**, 1287-98 (2007).